

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

0 352 500
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21)

Anmeldenummer: 89112014.9

(51)

Int. Cl.⁴: **A61K 39/395** , // **A61K35/16**

(22)

Anmeldetag: 01.07.89

Geänderter Patentanspruch gemäss Regel 86 (2)
EPÜ für folgenden Vertragsstaat: ES + GR

(30)

Priorität: 27.07.88 DE 3825429

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
31.01.90 Patentblatt 90/05

(84)

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71)

Anmelder: **BIOTEST PHARMA GMBH**
Landsteiner Strasse 5
D-6072 Dreieich(DE)

(72)

Erfinder: **Möller, Wolfgang, Dr.**
Graf-von-Stauffenberg-Strasse 32
D-6370 Oberursel(DE)
Erfinder: **Dichtelmüller, Herbert, Dr.**
Rosertstrasse 14
D-6231 Sulzbach/Ts.(DE)
Erfinder: **Kothe, Norbert, Dr.**
Friedrich-Ebert-Strasse 21
D-6242 Kronberg(DE)
Erfinder: **Rudnick, Dieter, Dr.**
Görlitzer Strasse 16
D-6074 Rödermark(DE)
Erfinder: **Piechaczek, Detlef, Dr.**
Darmstädter Strasse 54
D-6115 Münster(DE)

(74)

Vertreter: **Wolff, Hans Joachim, Dr.jur.**
Dipl.-Chem. et al
Beil, Wolff & Beil Rechtsanwälte Postfach 80
01 40 Adelonstrasse 58
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(54)

Intravenös verabreichbares polyklonales Immunglobulin-Präparat mit hohem IgM-Gehalt und Verfahren zu seiner Herstellung.

(57)

Intravenös verabreichbares polyklonales Immunglobulin-Präparat zur Therapie und Prophylaxe von bakteriellen Infektionen, das mindestens 50 Gew.-% IgM, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, und eine niedrige antikomplementäre Aktivität aufweist sowie in wässriger Lösung stabil und frei von Viren ist. Es kann auch aus einer Mischung mehrerer monoklonaler IgM-Antikörper bestehen oder solche zusätzlich enthalten. Die Herstellung geht aus von einer immunglobulinhaltigen Fraktion menschlichen, tierischen oder bakteriellen Ursprungs. Die Fraktion wird mit einem Anionenaustauscher behandelt, dieser mit einem Salz- oder pH-Gradienten eluiert und das Eluat gegebenenfalls einer Gelfiltration unterworfen. Vor oder nach der Chromatographie wird eine Behandlung mit β -Propiolacton und PEG 4000 und gegebenenfalls ein Erhitzen vorgenommen. Ausserdem kann eine Behandlung mit β -Propiolacton und UV-Licht, mit Detergentien oder eine Pasteurisierung erfolgen. Gegebenenfalls können Proteine, Zucker oder Aminosäuregemische dem Präparat zugesetzt werden.

EP 0 352 500 A2

Intravenös verabreichbares polyklonales Immunglobulin-Präparat mit hohem IgM-Gehalt und Verfahren zu seiner Herstellung

Immunglobuline spielen bei der Infektabwehr beim Menschen eine sehr wichtige Rolle. Die Immunglobuline sind dabei nicht einheitlich, sondern lassen sich in verschiedene Klassen mit verschiedenen biochemischen und physiologischen Eigenschaften aufteilen. Bei der Abwehr gegen virale Erreger sind besonders die IgG-Moleküle beteiligt, während die IgM-Antikörper vorzugsweise bakterielle Infektionen bekämpfen.

IgM ist aufgrund seiner pentameren Struktur besonders gut zur Agglutinierung von Bakterien geeignet. Ausserdem aktiviert IgM 100 - 400 mal mehr Komplement als IgG und ist bei der Opsonierung von Bakterien 100 mal wirksamer als das monomere IgG.

Die Gabe von IgM-haltigen Präparaten sollte deshalb zur Therapie von bakteriellen Infektionen besonders geeignet sein. Immunglobulinpräparate werden seit über 30 Jahren in der Klinik zur Therapie und Prophylaxe verschiedenster Krankheiten erfolgreich eingesetzt. Es handelt sich dabei aber überwiegend um reine IgG-Präparationen, eventuell mit Spuren an IgA und Igm. Waren die ersten Präparate nur intramuskulär verträglich, so stehen seit über 20 Jahren auch intravenös applizierbare IgG-Präparate zur Verfügung. Die Verfahrensschritte, die zur Senkung der antikomplementären Aktivität und damit zur intravenösen Verträglichkeit führen, sind in der Literatur (7 - 10) beschrieben.

Sämtliche Verfahren waren bis 1980 nur auf IgG angewendet worden. In EP 13 901 wurde dann 1980 zum ersten und bisher einzigen Mal ein intravenös verträgliches IgM-Präparat (Pentaglobin^(R)) beschrieben. Dieses nach Behandlung mit 0,05 bis 0,15% β -Propiolacton intravenös verträgliche Immunglobulinpräparat enthält neben 10% IgM noch 80% IgG und 10% IgA.

Andere Immunglobulinpräparate, wie sie z.B. in den Patenten: SU-PS 836 831 oder DE-PS 2 404 265 beschrieben werden, sind in ihrem IgM-Anteil mit 20 - 30% höher angereichert, dafür aber nicht intravenös verträglich.

Auch immunologisch reine IgM-Präparate, wie von Van der Hofen, Immunochemistry 1973, 10, 107-114, beschrieben, eignen sich wegen ihrer hohen antikomplementären Aktivität nicht zur intravenösen Anwendung und stehen deshalb bisher nicht für eine Therapie bakterieller Infektionen zur Verfügung.

Die einzige Möglichkeit der Applikation von IgM-Präparaten mit einem IgM-Anteil im Bereich von mehr 20% bestand bisher nur in der intramuskulären Gabe. Abgesehen davon, dass diese Applikation sehr schmerzhaft ist, lassen sich auf diese Weise keine grösseren Mengen IgM verabreichen und die Konzentration des Igm im Blut lässt sich so nicht nennenswert erhöhen.

Das Ziel der Erfindung war die Bereitstellung eines hochgereinigten, zur intravenösen Anwendung geeigneten IgM-Konzentrates für die Therapie und Prophylaxe bakterieller Infektionen.

Dieses Ziel wird durch ein Immunglobulin-Präparat erreicht, das mindestens 50 Gew.-% IgM, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, enthält, eine niedrige antikomplementäre Aktivität aufweist, in wässriger Lösung stabil und frei von Viren ist. Ein solches Präparat kann aus der aus Plasma oder anderen Quellen menschlichen, tierischen oder bakteriellen Ursprungs gewonnenen IgM-haltigen Fraktion durch Behandlung mit einem Ionenaustauscher, Eluieren des Austauschers mit einem Salz- oder pH-Gradienten und Gelfiltration hergestellt werden, wobei vor oder nach der Chromatographie mit β -propiolacton behandelt und mit PEG 4000 gefällt und gegebenenfalls erhitzt wird. Daran anschliessen können sich gegebenenfalls an sich bekannte Massnahmen, die auch der Sterilisierung dienen, wie Behandlung mit β -Propiolacton und UV-Licht oder Behandlung mit Solventien und Detergentien oder Pasteurisieren.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, das Präparat aus einer Mischung mehrerer monoklonaler IgM-Antikörper herzustellen oder einen oder mehrere solcher monoklonaler IgM-Antikörper dem nach dem vorstehenden Verfahren hergestellten Präparat zuzusetzen.

Vorzugsweise beträgt die Konzentration an IgM mindestens 50%. Das injizierbare Präparat ist eine Lösung, in der das erfindungsgemässe Präparat in einer Konzentration von 1 bis 20, vorzugsweise 3-5 g/100 ml, vorliegt.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass das nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellte IgM-Präparat mit einem IgM-Anteil von mehr als 50% in seiner antikomplementären Aktivität so weit gesenkt war, dass es intravenös verträglich war. Dieses Ergebnis war selbst nach den in EP 13 901 dargestellten Ergebnissen nicht zu erwarten, da es sich dort nur um eine rund 10%ige IgM-Lösung handelt, die zudem noch durch einen Anteil von 90% IgG und IgA stabilisiert wird.

Die antibakterielle Wirksamkeit des erfindungsgemässen Präparats wurde in Tierexperimenten im Vergleich zu dem 10%igen IgM-Präparat aus EP 13 901 überprüft. Überraschenderweise wurde dabei gefunden, dass die Wirksamkeit des erfindungsgemässen Präparats höher war, als dies nach dem IgM-

Gehalt zu erwarten war. Völlig unerwartet wurde gefunden, dass sich die antibakterielle Wirksamkeit des IgM-Konzentrats dadurch erhöhen liess, dass man den Gehalt an IgG und IgA absenkte. Dies bedeutet mit anderen Worten, dass gleiche Konzentrationen an IgM dann besonders wirksam sind, wenn möglichst wenig IgG und IgA vorhanden sind.

- 5 Mit den bisher nach dem Stand der Technik erhältlichen IgM-Präparaten ist ein solcher Effekt nicht zu erzielen, da entweder die intramuskulär applizierbare Menge zu gering ist oder der IgG- und IgA-Anteil zu hoch sind.

Ein erfindungsgemässes Präparat kann auf folgendem Wege hergestellt werden:

- Eine IgM-haltige Fraktion, vorzugsweise die Cohn-Fraktion III aus der Cohn'schen Alkoholfractionierung
 10 oder die bei der chromatographischen Isolierung von IgG aus plasma anfallende IgM-Fraktion, wird mit 1 bis 5% Oktansäure, vorzugsweise 2,5% Oktansäure, gefällt. Der IgM-haltige Überstand wird anschliessend auf einen Anionenaustauscher, z.B. mit DEAE, QAE oder QMA-Gruppen bei pH 5,5-7,5 aufgetragen. Die IgM-Fraktion wird gebunden und anschliessend mit einem Salzgradienten oder einem pH-Gradienten eluiert. Nach einem Ankonzentrierungsschritt durch Ultrafiltration wird das IgM-Eluat mit 0,05 bis 5 ml β -Propiolacton pro 100 ml IgM-Lösung behandelt. Diese Reaktion wird vorzugsweise bei 20-37 °C und bei pH 7,0 bis
 15 9,0, vorzugsweise pH 8,0 für 1 bis 10 Stunden durchgeführt, bis das β -Propiolacton vollständig verbraucht worden ist. Zur weiteren Reduktion der antikomplementären Aktivität wird die IgM-Lösung mit 1 - 3 % PEG 4000, vorzugsweise 2,5 % PEG bei 0-10 °C, vorzugsweise 5 °C, pH 4,5 - 5 versetzt und der entstehende Niederschlag abzentrifugiert.

- 20 Bei hohen Ausgangswerten für die antikomplementäre Aktivität kann man die IgM-Lösung gegebenenfalls zusätzlich für 0,5 bis 4 Stunden, vorzugsweise 1 Stunde auf 40 - 60 °C, vorzugsweise 57 °C, erhitzen.

- Nach dieser Behandlung beträgt die Reinheit des IgM-Konzentrates über 50 % IgM bezogen auf das Gesamtimmunglobulin. Zur weiteren Aufreinigung kann die Lösung über ein Gelchromatographiematerial mit einer Ausschlussgrenze von über 500.000 D, z.B. Sephacryl S400HR, S300HR oder Sepharose CL6B
 25 chromatographiert werden. Die Massnahmen zur Senkung der antikomplementären Aktivität können auch in anderer Reihenfolge durchgeführt werden. Z.B. kann man auch vor der Anionenaustauschchromatographie mit β -Propiolacton behandeln und nach der Ausschlusschromatographie erhitzen oder man erhitzt vor der Behandlung mit β -Propiolacton und der PEG-Fällung.

Die IgM-Fraktion wird gesammelt, in bekannter Weise aufgearbeitet und sterilfiltriert.

- 30 Die folgenden Beispiele erläutern das erfindungsgemässe Herstellungsverfahren weiter.

Beispiel 1

- 35 1 kg Cohn-Paste III wurde in 5 l 0,1 M Acetatpuffer, pH 5, gelöst und mit 2,5% Oktansäure bei 25 °C versetzt. Nach 4 Stunden wurde der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand gegen 0,025M Trishydroxymethylaminomethan, pH 6,5, diafiltriert. Die Lösung wurde dann auf eine 3 l Säule mit QA-Trisacryl-LS in gleichem Puffer aufgetragen. Das IgM wurde an den Träger gebunden und anschliessend mit 0,3 M NaCl eluiert. Das Eluat wurde auf einen Proteingehalt von 40 g/l ankonzentriert, 1 h auf 57 °C
 40 erhitzt und mit 0,15% β -Propiolacton über Nacht bei 25 °C und pH 8,0 behandelt. Die Lösung wurde anschliessend mit 2,5 g pro 100 ml PEG 4000 bei pH 4,5 versetzt, 1 Stunde bei 4 °C gerührt und zentrifugiert. Der Überstand wurde dann über eine 20 l Säule mit Sephacryl S400 HR chromatographiert. Die 2. Fraktion, die das IgM enthielt, wurde ultrafiltriert und sterilfiltriert. Der IgM-Gehalt betrug 85% bei 5% IgG und 9% IgA. Der Gesamtimmunglobulingehalt betrug 99%.

45

Beispiel 2

- Ein Pool aus 50 l Humanplasma wurde bei 4 °C aufgetaut und das Kryopräzipitat abgetrennt. Nach der
 50 Entfernung der PPSB-Faktoren mit DEAE-Sephadex und des Fibrinogens durch Fällung mit 9% Ethanol bei pH 5,3 wurde das Restplasma auf ein Ionenmilieu von 22 mM Trishydroxymethylaminomethan/HCl, pH 7,5, eingestellt. Anschliessend wurde über eine mit gleichem Puffer äquilierte 10 l Säule mit DEAE-Trisacryl-LS chromatographiert. Das gebundene IgM wurde mit 0,3 M NaCl, pH 7,0, eluiert. Das Eluat wurde mit 25% Ethanol bei -3 °C und pH 7,5 gefällt und der Niederschlag in 0,1 M Acetat-Puffer, pH 5, auf einen
 55 Proteingehalt von 50 g/l gelöst. Die Lösung wurde mit 2,5% Oktansäure bei 25 °C und pH 5 versetzt und der Niederschlag abgetrennt. Der Überstand wurde mit 0,11% β -Propiolacton für 5 Stunden bei 25 °C und pH 7 behandelt und anschliessend mit 2,5 g/100 ml PEG 4000 für 1 Stunde bei 4 °C gefällt und zentrifugiert. Anschliessend wurde der Überstand in 3 Läufen über eine 20 l Säule mit Sephacryl S400

chromatographiert. Die 2. Fraktion wurde ultrafiltriert und sterilfiltriert. Diese 2. Fraktion enthielt das IgM in einer Reinheit von 93% bei 2% IgG und 5% IgA. Der Gesamtimmunglobulinanteil betrug 100%.

5 Beispiel 3

1 kg Paste III wurde analog zu Beispiel 1 mit Oktansäure gefällt und der Überstand gegen 0,025 M Trishydroxymethylaminomethan, pH 7,0 diafiltriert. Die Lösung wurde dann auf eine 3 l Säule QMA-Accell in gleichem Puffer aufgetragen.

10 Das IgM wurde an den Träger gebunden und nach dem Waschen der Säule mit 0,05 M Natriumacetat, pH 4,5 eluiert. Das Eluat wurde analog zu Beispiel 1 mit PEG 4000 und β -Propiolacton behandelt. Anschließend wurde der Überstand über eine 2 l Säule Sephadex G 25 umgepuffert, ultrafiltriert und sterilfiltriert. Der IgM-Gehalt betrug 73 % bei 20 % IgA und 7 % IgG. Der Gesamtimmunglobulin-Gehalt betrug 100 %

15 Zusätzlich zu der Behandlung mit β -Propiolacton kann auch eine Behandlung mit β -Propiolacton und UV-Licht oder mit Detergentien und Solventien, vorzugsweise Tri-n-butylphosphat und TWEEN 80, oder eine Pasteurisierung treten. Diese Behandlung kann ebenso wie das Erhitzen auch im Anschluss an die Gelfiltration erfolgen.

Gegebenenfalls können dem Präparat auch Proteine, vorzugsweise Humanalbumin, Zucker, vorzugsweise Maltose, oder Aminosäuregemische zugesetzt werden.

20 Ein nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestelltes IgM-Konzentrat wurde mit dem als Ausgangsmaterial dienenden Handelsprodukt Pentaglobin, das IgG, IgA und IgM enthält, sowie mit einer ebenfalls aus diesem Ausgangsmaterial hergestellten IgG-Fraktion verglichen. Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

25

1. Charakterisierung der Vergleichspräparate

Die Bestimmung der Immunglobuline IgG, IgA und IgM erfolgte mit Antisera nephelometrisch. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte mit der Biuret-Methode. Die Daten der einzelnen Prüfpräparate sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

30

Tabelle 1

35

| Daten der Prüfpräparate | | | | | |
|-------------------------|----------------------------|-------|-------------|-----|-----|
| Präp.-Nr. | Präparat | Prot. | IgG | IgA | IgM |
| | | (g/l) | (mg/100 ml) | | |
| 1 | Pentaglobin ^(R) | 51,5 | 3720 | 920 | 750 |
| 2 | IgG-Fraktion | 48,9 | 3770 | 890 | 70 |
| 3 | IgM-Konzentrat | 8,1 | 40 | 70 | 750 |

40

45

2. Tierexperimentelle Prüfung

50

Die antibakterielle Wirksamkeit des erfindungsgemässen IgM-Konzentrates (Präp. Nr. 3) wurde im Vergleich zu Pentaglobin (Nr. 1) und einer IgG-Fraktion (Nr. 2) in der Pseudomonas-infizierten Maus durchgeführt (1). Die Überlebensraten sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

55

Tabelle 2

| 5 | Ergebnisse des Mäuseschutz-Tests | | |
|----|----------------------------------|-----------------------------------|---|
| | Präp.-Nr. | Präparat | geschützte Mäuse (%) 21 Stunden nach Infektion |
| 10 | 1 | Pentaglobin ^(R) | 47,6 |
| | 2 | IgG-Fraktion | 33,3 |
| | 3 | IgM-Konzentrat (erfindungsgemäss) | 66,7 |
| | 4 | unbehandelt | 9,5 |

Das erfindungsgemässe IgM-Konzentrat (3) hat demnach bei einem Proteingehalt von 1/5 der Präparate
1 und 2 eine signifikant höhere Schutzwirkung als diese Präparate.

3. Bestimmung der antikomplementären Aktivität (ACA)

Die ACA - als Mass für die intravenöse Verträglichkeit wurde nach der Methode von Kabat und Mayer
(2) bestimmt. Die Ergebnisse für handelsübliche Präparate im Vergleich zum erfindungsgemässen IgM-
Konzentrat - jeweils als 5%ige Lösungen getestet - sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3

| 25 | ACA von i.v. Immunglobulinpräparaten | | | |
|----|--------------------------------------|-----------------------------------|------------|----------------------------------|
| | Nr. | Prüfpräparat | IgM (%) | ACA (μ IC 1:30/mg Prot.) |
| 30 | 1 | Intraglobin ^(R) | 0 | 10 |
| | 2 | Pentaglobin ^(R) | 10 | 25 |
| | 3 | erfindungsgemässes IgM-Konzentrat | 75 | 25 |

Der Wert für das erfindungsgemässe IgM-Konzentrat ist vergleichbar mit dem seit 1985 verfügbaren
IgM-haltigen Präparat Pentaglobin^(R).

4. Versuche zur Virus-Inaktivierung

Das erfindungsgemässe IgM-Konzentrat wurde mit Bakteriophagen vom Typ ϕ x 174 und mit Sendai-
Viren versetzt. Sterilisiert wurde mit β -Propiolacton (3), β -PL/UV (4), Solvent/Detergent (3) und durch
Pasteurisation (10 h, 60 °C) (5). Tabelle 4 gibt die Versuchsergebnisse wieder.

Tabelle 4

| 50 | Virusinaktivierung in IgM-Konzentraten | | | |
|----|--|--------------|------------------------|--|
| | Protein-Konz. (g/100 ml) | Virus Typ | Sterilisationsmethoden | Inaktivierung (log ₁₀ ⁺) |
| 55 | 4 | ϕ x 174 | β -PL | >7 |
| | 4 | ϕ x 174 | β -PL/UV | 7 |
| | 0,5 | Sendai | Solv/Det. | >4,5 |
| | 5 | ϕ x 174 | past. | >8,0 |

Die Ergebnisse zeigen eine so hohe Sterilisationseffektivität der einzelnen Verfahren, dass eine Virusübertragung eines nach einem der Verfahren der Tabelle 4 sterilisierten IgM-Konzentrates auszuschliessen ist.

5. Versuche zur Lagerstabilität

Das erfindungsgemässe IgM-Konzentrat wurde als 1,6%ige Lösung (1,2 g/100 ml Igm) 4 h auf 57° C erhitzt. Es wurde mit der passiven Hämagglutinationsmethode (PHA) nach Neter (6) auf Antikörper gegen folgende Bakterien geprüft: E. coli, Klebsiellen, Streptokokken. Die Aktivitäten vor bzw. nach der Erhitzung sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5

| Reziproke antibakterielle Ak-Titer in IgM-Konzentraten im Vergleich zu Pentaglobin ^(R) | | | | |
|---|--------------|-------------|---------------|-------------|
| Anti- | IgM-Konz. | Pentaglobin | IgM-Konz. | Pentaglobin |
| | vor Erhitzen | | nach Erhitzen | |
| E. coli | 640 | 160 | 320 | 160 |
| Klebsiellen | 1280 | 640 | 640 | 320 |
| Streptokokken | 320 | - | 160 | - |
| Strep.virid. | 320 | 160 | 160 | 40 |

Das erfindungsgemässe IgM-Konzentrat ist in seinen immunologischen Aktivitäten unter Berücksichtigung der Fehlerbreite der Bestimmungsmethoden (± 1 Titerstufe) hitzestabil. Es verhält sich bezüglich der Lagerstabilität wie das Igm-haltige Handelspräparat Pentaglobin^(R).

Literatur

- Stephan W., Dichtelmüller H.: Comparison in vitro behaviour and in vivo efficacy of two 7s immunoglobulin preparations for intravenous use. Arzneimittel Forsch./Drug Res. 33 (II) 11, 1538-1540 (1983)
- Mayer M.M.: Complement and Complement fixation In: Kabat E.A., Mayer M.M. (eds): Experimental Immunochemistry 2nd ed. Thomas Brooks, Springfield, II pp. 133-240 (1964)
- Prince A.M., Horowitz B., Dichtelmüller H., Stephan W., Gallo R.C.: Quantitative assays for evaluation of HTLV-III inactivation procedures: Tri(n-butyl)phosphate:sodium cholate and β -propiolacton. Cancer Research 45, 4592s-4594s (1985)
- Prince A.M., Stephan W., Dichtelmüller H., Brotman B., Huima T.: Inactivation of the Hutchinson strain of non-A/non-B hepatitis virus by combined use of β -propiolactone and ultraviolet irradiation. J. med. Virol. 16:119-125 (1985)
- Heimbürger N., Wormsbächer W., Kumpe G.: Pasteurisierte, isoagglutininfreie F. VIII-Präparation und Verfahren zu ihrer Herstellung. Europ. Patentanmeldung -0 173 242 (1985)
- Neter E.: Bact. Rev. 20, 166 (1956)
- Schultz H.E., Schwick G.: Dtsch. med. Wochenschrift, 87, 1643 (1962)
- Barandun S. et al.: Vox Sang. 28, 157 (1957)
- Barandun S. et al.: Vox Sang. 7, 187 (1962)
- Stephan W.: Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7, 282 (1969)

Ansprüche

- Intravenös verabreichbares polyklonales Immunglobulin-Präparat zur Therapie und Prophylaxe von bakteriellen Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass es
 - a) mindestens 50 Gew.-% IgM, bezogen auf den vorhandenen Gesamtimmunglobulingehalt, enthält,

- b) eine niedrige antikomplementäre Aktivität aufweist,
- c) in wässriger Lösung stabil und
- d) frei von Viren ist.

2. Immunglobulinpräparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es aus einer Mischung von mehreren monoklonalen IgM-Antikörpern besteht.

3. Immunglobulinpräparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich einen oder mehrere monoklonale IgM-Antikörper enthält.

4. Immunglobulinpräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich Proteine, vorzugsweise Humanalbumin, Zucker, vorzugsweise Maltose, oder Aminosäuregemische enthält.

5. Immunglobulinpräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es als Lösung mit einer Proteinkonzentration von 1 bis 20 g/100 ml, vorzugsweise 3 bis 5 g/100 ml, vorliegt.

6. Verfahren zur Herstellung von Immunglobulinpräparaten nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man es aus immunglobulinhaltigen Plasmafraktionen menschlichen, tierischen oder bakteriellen Ursprungs isoliert.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man die immunglobulinhaltige Fraktion mit einem Ionenaustauscher behandelt, diesen mit einem Salz- oder pH-Gradienten eluiert, das Eluat einer Gelfiltration unterwirft und vor oder nach der Anionenaustauschchromatographie oder der Gelfiltration mit β -Propiolacton und mit PEG 4000 behandelt und gegebenenfalls erhitzt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Anionenaustauscher DEAE-Trisacryl-LS, QA-Trisacryl oder QMA-Accell verwendet.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass man als Gel für die Gelfiltration Sephacryl S400HR oder S300HR verwendet.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man das Präparat vor oder nach der Anionenaustauschchromatographie oder der Gelfiltration mit β -Propiolacton oder β -Propiolacton und UV-Licht und mit 1-3% PEG 4000 bei 0-10°, vorzugsweise 5°C und pH 4,5-5, behandelt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man 0,5 bis 5 Stunden lang bei 40 bis 60°C, vorzugsweise 1 Stunde lang bei 57°C erhitzt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man das Präparat mit Solventien und Detergentien, vorzugsweise Tri-n-butylphosphat und TWEEN 80, vor oder nach der Gelfiltration behandelt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man das Präparat vor oder nach der Gelfiltration pasteurisiert.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man dem Präparat Proteine, vorzugsweise Humanalbumin, Zucker, vorzugsweise Maltose, oder Aminosäuregemische zusetzt.
Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES und GR

1. Verfahren zur Herstellung von intravenös verabreichbaren polyklonalen Immunglobulinpräparaten zur Therapie und Prophylaxe von bakteriellen Infektionen mit mindestens 50 Gew.-% Igm, bezogen auf den vorhandenen Gesamtimmunglobulingehalt, einer niedrigen antikomplementären Aktivität, das in wässriger Lösung stabil und frei von Viren ist, dadurch gekennzeichnet, dass man es aus immunglobulinhaltigen Plasmafraktionen menschlichen, tierischen oder bakteriellen Ursprungs isoliert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die immunglobulinhaltige Fraktion mit einem Ionenaustauscher behandelt, diesen mit einem Salz- oder pH-Gradienten eluiert, das Eluat einer Gelfiltration unterwirft und vor oder nach der Anionenaustauschchromatographie oder der Gelfiltration mit β -Propiolacton und mit PEG 4000 behandelt und gegebenenfalls erhitzt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Anionenaustauscher DEAE-Trisacryl-LS, QA-Trisacryl oder QMA-Accell verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Gel für die Gelfiltration Sephacryl S400HR oder S300HR verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man das Präparat vor oder nach der Anionenaustauschchromatographie oder der Gelfiltration mit β -Propiolacton oder β -Propiolacton und UV-Licht und mit 1-3% PEG 4000 bei 0-10°, vorzugsweise 5°C und pH 4,5-5, behandelt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man 0,5 bis 5 Stunden lang bei 40 bis 60°C, vorzugsweise 1 Stunde lang bei 57°C erhitzt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man das Präparat mit Solventien und Detergentien, vorzugsweise Tri-n-butylphosphat und TWEEN 80, vor oder nach der Gelfiltration behandelt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man das Präparat vor oder nach der Gelfiltration pasteurisiert.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man dem Präparat Proteine, vorzugsweise Humanalbumin, Zucker, vorzugsweise Maltose, oder Aminosäuregemische zusetzt.

5 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man dem Präparat einen oder mehrere monoklonale IgM-Antikörper zusetzt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man die Proteinkonzentration auf 1 bis 20 g/100 ml, vorzugsweise auf 3 bis 5 g/100 ml, einstellt.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: **89112014.9**

51 Int. Cl.⁵: **A61K 39/395, //A61K35/16**

22 Anmeldetag: **01.07.89**

30 Priorität: **27.07.88 DE 3825429**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
31.01.90 Patentblatt 90/05

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

88 Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: **25.07.90 Patentblatt 90/30**

71 Anmelder: **BIOTEST PHARMA GMBH**
Landsteiner Strasse 5
D-6072 Dreieich(DE)

72 Erfinder: **Möller, Wolfgang, Dr.**
Graf-von-Stauffenberg-Strasse 32
D-6370 Oberursel(DE)
Erfinder: **Dichtelmüller, Herbert, Dr.**
Rossertstrasse 14
D-6231 Sulzbach/Ts.(DE)
Erfinder: **Kothe, Norbert, Dr.**
Friedrich-Ebert-Strasse 21
D-6242 Kronberg(DE)
Erfinder: **Rudnick, Dieter, Dr.**
Görlitzer Strasse 16
D-6074 Rödermark(DE)
Erfinder: **Piechaczek, Detlef, Dr.**
Darmstädter Strasse 54
D-6115 Münster(DE)

74 Vertreter: **Wolff, Hans Joachim, Dr.jur.**
Dipl.-Chem. et al
Beil, Wolff & Beil Rechtsanwälte Postfach 80
01 40 Adelonstrasse 58
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

54 **Intravenös verabreichbares polyklonales Immunglobulin-Präparat mit hohem IgM-Gehalt und Verfahren zu seiner Herstellung.**

EP 0 352 500 A3 57 Intravenös verabreichbares polyklonales Immunglobulin-Präparat zur Therapie und Prophylaxe von bakteriellen Infektionen, das mindestens 50 Gew.-% IgM, bezogen auf den Gesamtimmunglobulingehalt, und eine niedrige antikomplementäre Aktivität aufweist sowie in wässriger Lösung stabil und frei von Viren ist. Es kann auch aus einer Mischung mehrerer monoklonaler IgM-Antikörper bestehen oder solche zusätzlich enthalten. Die Herstellung geht aus von einer immunglobulinhaltigen Fraktion menschlichen, tierischen oder bakteriellen Ursprungs. Die Fraktion wird mit einem Anionenaustauscher behandelt, dieser mit einem Salz- oder pH-Gradienten eluiert und das Eluat gegebenenfalls ei-

ner Gelfiltration unterworfen. Vor oder nach der Chromatographie wird eine Behandlung mit β -Propiolacton und PEG 4000 und gegebenenfalls ein Erhitzen vorgenommen. Ausserdem kann eine Behandlung mit β -Propiolacton und UV-Licht, mit Detergentien oder eine Pasteurisierung erfolgen. Gegebenenfalls können Proteine, Zucker oder Aminosäuregemische dem Präparat zugesetzt werden.



| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | | |
|---|---|---|--|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | Betrifft Anspruch | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5) |
| E | EP-A-0 345 543 (MILES INC.)(13-12-1989) * Anspruch 1; Zusammenfassung * --- | 1,6-13 | A 61 K 39/395// A 61 K 35/16 |
| A | US-A-4 371 520 (VEMURA et al.) * Insgesamt * --- | 1-14 | |
| A | EP-A-0 123 029 (LENTIA Gmb) * Insgesamt * --- | 1-14 | |
| P,A | EP-A-0 303 088 (MILES INC.)(15-02-1989) * Insgesamt * ----- | 1-14 | |
| | | | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5) |
| | | | A 61 K C 12 P |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt | | | |
| Recherchenort DEN HAAG | | Abschlußdatum der Recherche 08-05-1990 | Prüfer ROSDY M.K.P. |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | | | |